

Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances anterior cervical fusion with porous hydroxyapatite graft in a caprine model

| | |
|--------|---|
| 著者 | 高橋 敏行 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/54858 |

博士論文

頸椎前方固定術における骨形成蛋白-2

(bone morphogenetic protein-2)

の効果に関する実験的研究

東北大学大学院医学系研究科外科系専攻

脳神経外科学講座

高橋敏行

(1) 要約

本研究は、より低侵襲で効率の良い頸椎前方固定術をめざして、組換え型ヒト骨形成因子-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2: rhBMP-2) の椎体癒合に対する効果を検討することを目的とした。

14頭の雌ヤギに対し、全身麻酔下で3椎間の頸椎椎間板切除および後縦靱帯の切開を施行した。椎間板摘出腔に多孔性ハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite: HA) 単独、低用量 ($5\mu\text{g}$) あるいは高用量 ($50\mu\text{g}$) のrhBMP-2を含浸させたHAブロックを移植し、外固定の代用として前方プレートによる内固定を併用した。全42椎間に対し術直後、術後4週及び12週に放射線学的、生体力学的及び組織学的に椎体癒合過程を検討した。

X線単純写及びCTスキャンでは術後12週

において対照群では骨形成を認めないものの、低用量BMP群では33%に、高用量BMP群では67%に骨形成を認めた。また、移植HA部位の骨密度は対照群、低及び高用量BMP群いずれも経時的に増加したが、術後4週及び12週における各群間の比較では骨密度に有意差を認めなかった。移植HA周囲の母床骨における骨密度は対照群を除き経時的に増加し、術後12週では対照群に対し高用量BMP群の骨密度は有意に高値を示した。

用手試験では術後12週で対照群および低用量BMP群の骨癒合率が33%であったのに対し、高用量BMP群では全例で骨癒合を認めた。また前屈、後屈、側屈及び回旋方向への荷重負荷では術後4週の前屈負荷にて、対照群と比較して高用量BMP群の剛性値が有意に増加した。術後12週の荷重負荷では前屈方向で高用量BMP群の剛性値が他群に対し増加し、後屈及び側屈方向では対照群に対

し高用量BMP群が有意に剛性値の高値を認めた。

組織学的には術後4週において対照群では移植HA周辺に骨新生は認めなかった。これに対し低用量BMP群では33%で移植HA全周に対し25%未満の軽度骨新生を認め、高用量BMP群では67%で移植HA周囲に軽度骨新生を認め、17%に移植HAの気孔内骨新生が認められた。術後12週において対照群では17%に移植HA全周に対し50%未満の中等度骨新生を、67%に軽度骨新生を認め、17%で気孔内骨新生を認めた。低用量BMP群では各々50%に移植HA周囲の軽度あるいは中等度の骨新生を認め、33%に気孔内軟骨及び骨新生を認めた。高用量BMP群では軽度、中等度あるいは移植HA全周に対し50%以上の高度骨新生をそれぞれ17%、50%、33%に認めた。気孔内骨新生は33%に認められた。気孔内の骨新生の範囲は対照

群、BMP使用群伴に移植HA表面より最大でも2-3mmであったが、全体の気孔面積に占める骨新生面積はBMP使用群で著明であった。

以上の結果より、rhBMP-2は、ヤギ頸椎椎間癒合において用量依存的な促進効果を有することが明らかとなった。この促進効果はHAと椎体間の骨新生増加によるものと考えられた。また多孔性HAは、椎間移植代用骨としての働きのみならず、rhBMP-2の担体としても有用であることが明らかとなった。

(2) 研究背景

外傷、変性疾患、腫瘍性病変等多くの頸椎疾患において、神経症状改善のために頸椎前方除圧固定術が施行される。頸椎の除圧操作は手術器具、手技等の向上により安全かつ効果的に行えるようになった。脊椎の中でも特に頸椎は重要な神経血管構造を保護しながら多方向の運動が要求される特殊器官であり、頭蓋の支持組織である。このため除圧後頸椎が不安定性を有する場合その再建は重要な位置を占める。現在頸椎の前方要素再建には、自家骨、主に腸骨が用いられている。自家骨は免疫学的拒絶反応がなく、移植骨の骨血管構造をもとに骨新生するために速やかな骨癒合が得られる利点がある。また腸骨は採取に際し手術体位に制限されず、移植骨の3面が皮質骨である tricortical bone を採取することが可能であるため移植後の力学的強度も確保される。これまでも単椎間の腸骨移植

による前方固定術では、満足すべき骨癒合率が得られている^{1, 2)}。しかし、腸骨採取には頸椎手術に加え採骨のための手術侵襲を必要とし、採骨部の合併症は重篤なものも少ないものの疼痛、不快感など軽微なものも含めると約20%に達するという報告もある³⁻⁵⁾。

また採取する腸骨量に限界があり、複数回の採骨を必要とする場合や、代謝性骨疾患を有する患者では移植が困難となる場合もある。移植後、移植骨と母床骨の骨癒合が完成するまでの期間、患者は最短でも数カ月間は頸椎に負荷のかかる活動には復することができない。

このような頸椎再建上の問題点を解決するために、骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein; BMP) を頸椎椎体癒合に応用し、その担体として多孔性セラミックス製の人工骨を用いることに着眼した。自家骨に代わりうる人工骨材料の応用

及びBMPによる骨癒合期間の短縮は、移植後の合併症を軽減し、患者のQOLの向上に寄与すると期待される。

BMPは、1965年Uristにより異所性に骨誘導現象を引き起こす蛋白として報告され⁶⁾、1971年に骨形成蛋白と命名された。現在までに同定されたBMP類縁因子は、ヒト以外の種より発見された近縁因子群を含め十数種類に及ぶ。BMPのほとんどはTGF- β スーパーファミリーに属し、その作用は骨形成のみならず、個体の形態形成にも関与している^{7,8)}。BMP-2は、1988年に単離された分子量約3万の糖蛋白であり^{9,10)}、骨誘導能(osteoiduction)を有する蛋白性因子として広範に研究されている¹¹⁻¹⁵⁾。分子生物学的に作成された組み替え型ヒト

(recombinant human: rh) BMP-2は、未分化間葉系細胞の骨芽細胞、軟骨芽細胞への分化促進、骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞へ

の分化促進等の増殖作用に加えて、これら細胞の他系統への分化を抑制する作用を有している。生体内においても未分化間葉系細胞を骨芽細胞、軟骨芽細胞に分化させ、最終的に造血骨髓を有する異所性骨組織を形成する。また正所性には骨膜細胞に作用して膜性骨では骨増殖を、長管骨では軟骨及び骨増殖を促進する¹⁶⁻¹⁸⁾。

ハイドロキシアパタイト

(hydroxyapatite; HA) は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の化学式で表され、骨、歯など脊椎動物の硬組織の主成分となっている生体内物質である。このためHAは生体内で異物として認識されず、優れた生体親和性 (biocompatibility) を示す¹⁹⁻²¹⁾。またHAは骨伝導能 (osteoconduction) を有するため周囲の生体骨組織と直接骨新生する²²⁾。本素材は、主にカルシウムとリン酸イオンを水溶液中で合成した高純度のHA粉

末を焼成して作成したセラミックス骨として使用され、近年、歯科、整形及び形成外科領域において骨補填材、骨置換材料として注目を浴び、頸椎外科分野においてもすでに移植骨として臨床応用されている^{23, 24)}。頸椎再建におけるHAセラミックス骨の問題点は、自家骨に比べ生体力学的に脆く、骨形成能や骨誘導能を持たない点にある。緻密性HAは十分な強度が認められており、椎体間移植骨として使用した場合でも圧壊の危険性は低下する。しかし緻密性HAと椎体骨との癒合は接着面における新生骨組織によるものであり、移植後に微細な運動負荷が存在する場合、HAの表面が軟部組織で覆われ骨融合が起こらない可能性もある²¹⁾。また緻密性HAは加工しにくいという欠点もある。これに対し多孔性HAは孔構造を介して気孔内に骨、血管構造が新生される。移植側の形状に合わせた加工も可能である。反面気孔率が増加する

ほど脆弱性が増すため、骨癒合が達成されるまでの期間は移植骨が脆く圧壊をきたす危険性がある。よって多孔性HAを椎間移植骨として使用する場合、何らかの力学的補強あるいは骨形成能、骨誘導能を有する物質による骨癒合及び気孔内への骨充填の促進が望まれる。

これまで、rhBMP-2あるいはHAを脊椎外科に応用した動物実験が報告されているが^{20, 21, 25-33)}、頸椎前方固定術にrhBMP-2及びHAを応用した動物実験の報告はない。またこれらの物質を応用する場合、rhBMP-2の適切な使用量や担体等については確定されていない。

(3) 研究目的

本研究の目的は、頸椎前方除圧後のより侵襲が少ない頸椎再建をめざし、実験的不安定頸椎モデルを用いて r h B M P - 2 の椎体癒合に対する効果を検討することにある。

この目的遂行のために実験動物としてヤギを用いた。ヤギは、解剖学的な構造、大きさがヒトに類似しており、臨床に用いられている H A 移植骨や手術器具がそのまま使用できる利点がある。またヤギは頸椎を直立していることが多いため他の四足動物と比べ力学的に理想的な荷重負荷がかかり、生体力学的評価が望まれる頸椎実験モデルとして優れている^{20, 21, 31)}。

r h B M P - 2 は、椎間に移植する多孔性 H A に含浸させてヤギ生体内に投与した。本実験において多孔性 H A は、移植骨としての働きの他に r h B M P - 2 の担体としての側面をもつ。このため本研究は、副次的に多孔性 H A の

rhBMP-2の担体としての作用も評価する。

1) 使用材料

移植材料として、旭光学工業株式会社で作製された気孔率40%、気孔径100-500 μm 、気孔間連絡の孔径が10-50 μm にピークを有する多孔性HAを使用した。多孔性HAは精製したHAパウダーと溶媒とを混練し約130℃で焼結して形成後、8mm(高さ)×15mm(横幅)×15mm(奥行き)のブロック状に成形加工されており、圧縮強度は 71.35 ± 5.24 Mpaであった。オートクレーブ滅菌後実験に用いた。

rhBMP-2は、1000 μg 含有の貯蔵溶液を0.01Mのリン緩衝液(Phosphate buffer solution; PBS)にて希釈し、0.2ml溶液中にrhBMP-2が5 μg あるいは50 μg 含有するように分量した。これを分注し使用直前まで-80度Cにて冷凍貯蔵した。実験で使用する際には、フーズ内で無菌操作

(4) 研究方法

1) 使用材料

移植材料として、旭光学工業株式会社で作製された気孔率40%、気孔径100-500 μm 、気孔間連絡の孔径が10-50 μm にピークを有する多孔性HAを使用した。多孔性HAは精製したHAパウダーと発泡剤とを混練し約1150℃で焼結して生成後、8mm（高さ）×15mm（横幅）×15mm（奥行）のブロック状に成形加工されており、圧縮強度は71.35±5.24 Mpaであった。オートクレーブ滅菌後実験に用いた。

rhBMP-2は、1000 μg 含有の貯蔵溶液を0.01Mのリン酸緩衝液（Phosphate buffer solution; PBS）にて希釈し、0.2ml溶液中にrhBMP-2が5 μg あるいは50 μg 含有するように分量した。これを分注し使用直前まで-80度Cにて冷凍貯蔵した。実験で使用する際には、フード内で無菌操作

にてマイクロピペットでrhBMP-2溶液を多孔性HAブロック表面に滴下含浸させた後自然乾燥させた。実験グループはrhBMP-2用量により3群に分類した。すなわち5 μ gのrhBMP-2を含有させた低用量BMP群、50 μ gのrhBMP-2を含有させた高用量BMP群あるいは0.2 mlのPBSのみを含浸させた対照群である。なお、rhBMP-2は米国のGenetic Institute社にて作製され、山之内製薬より提供されたものを使用した。

2) 実験動物モデル

ザーネン種の雌ヤギ14頭（体重40-55 Kg）を用いた。ヤギは術前後を通じて東北大学農学部動物飼育センターにて管理した。また、実験は東北大学農学部動物実験倫理規定に従って行われた。手術はすべて無菌操作とした。ハロセンと酸素による吸入麻酔下に気管切開後挿管し、血圧及び心電図モニター

下に人工呼吸器による調節呼吸をした。仰臥位にて頭頸部を固定し、頸部を剃毛消毒した後、頸部全面中央の気管の右側より進入し、頸動脈を右外側に気管食道を左側に圧排し、頸長筋を左右に剥離して椎体前面に達した。第3頸椎から第6頸椎までの椎体前面を露出した後、C3/4、C4/5、C5/6の椎間板を摘出し、後縦靱帯を切開した。各移植椎間腔は、上下椎体の骨皮質の一部を鋭匙、電動ドリルを用いて削除し、移植面をほぼ平行とした。移植に先立ちHAと同じサイズのレプリカを挿入し、椎間腔に間隙がないことを確認した。各椎間レベルには対照HA、低用量BMP含有HAあるいは高用量BMP含有HAを無作為に移植した。移植直後にフィブリン糊を椎間腔前面に散布し、各椎間を長さ25-35mmのチタン性頸椎前方プレートにて内固定した。術中および術後7日間は抗生物質を筋肉内投与し、術後2週間は個別ケージ内にて管理した。

3) 放射線学的評価

移植手術後それぞれ直後（2頭）、4週（6頭）、12週（6頭）めに、50mg/KgのThiopental Sodiumを静脈投与し安楽死させ、移植部位を含む第2頸椎から第7頸椎までを周辺の軟部組織を含め一塊として摘出した。摘出検体に対し直ちに頸椎単純写正面および側面像を撮影し、続いて椎体及び椎間レベル横断面のCT撮影（Xビジョン、東芝株式会社）を施行した。いずれの検体も単純写及びCT撮影は一定条件のもとに行った。単純写及びCT像にて椎間癒合の指標となる移植HA周囲の骨化の有無を評価した。また合併症として移植HAの亀裂、圧壊、逸脱の有無を観察し、また異所性骨化の有無を観察した。評価は筆者以外の脳神経外科医2名が行った。CT撮影後、頸椎椎体前面の軟部組織を正中切開し、前方プレートを摘出した。プレート摘出後、検体の移植骨および母床骨

の骨密度を測定した。骨密度の計測部位は側面透視像の移植HAあるいは移植HAに接する幅5mm以内の母床骨の範囲とし、二重エネルギーX線吸収法による骨密度測定器（BMD-1X，日立メディコ株式会社）を用いて計測した^{3,4)}。

4) 生体力学的評価

放射線学的評価終了後、検体の骨組織および靱帯、関節構造を損傷しないように筋肉を含む軟部組織を丁寧に剥離した。更に移植椎間を含む上下椎体中央部をダイヤモンドカッターで横断し、椎体/移植HA/椎体を一塊とする個々の試験片を作製した。試験片に対し始めに用手的な力学試験を施行した。すなわち試験片の両端を用手的に固定し前後屈、側屈、回旋方向に力を負荷し、可動性の有無を観察し骨癒合を評価した。いずれの方向に負荷しても可動性がない場合のみを骨癒合と判

定し、その評価は筆者以外の脳神経外科医2名が行った。次に試験片の上下椎体の両端部をそれぞれ直方形に型どったアクリルレジンを包埋固定し、力学試験のための検体を作製した。レジンが十分に乾燥した後、試験検体の両端のレジンを測定器械（東北大学工学部開発）に接続固定し、前屈、後屈、側屈及び回旋方向に、最大2.0Nmの荷重を負荷した。測定時に試験検体をビデオにて撮影し、荷重に伴う椎間関節の変位角度を測定し、荷重変位曲線を求め、得られた荷重変位曲線より剛性値を算出した。荷重試験は気温23度、湿度40%の一定条件のもと施行し、試験検体の保湿に留意した。また、荷重試験は検体摘出後、24時間以内に施行した。

5) 組織学的評価

生体力学的試験後、直ちに試験検体のアクリルレジンを除去し、ダイヤモンドカッター

にて検体を矢状方向に二分割した。一方の検体は10%中性ホルマリンで7日間固定し、他方の検体はVillanueva bone染色粉末を70%アルコールに溶解した溶液にて14日間固定した。各検体をアルコール及びアセトンにて脱水し、メチルメタクリレート包埋後厚さ300-400 μm の切片を作製した。更に組織切片を100 μm までに研磨した後、ポリエステル樹脂にて再包埋し、最終的に厚さ30 μm の研磨組織標本とした。10%中性ホルマリンにて固定した組織切片に対しHematoxylin-Eosin (HE) 染色及びtoluidine blue-O染色を施行し、他方の組織切片に対してはVillanueva bone染色を施行した。

作製した標本について、移植したHA周囲の組織反応、骨新生過程および気孔内の骨新生状態を表1に示す組織学的評価基準を作成し検討した。評価は筆者以外の脳神経外科医

2名が行った。

6) 統計学的分析

4週、12週後の移植HA内部及び周囲母床骨の骨密度について対照群、低及び高用量BMP群の個々の値を平均化し、同時期の骨密度について分散分析にて有意差を確認した後、Fisher's protected square defference (Fisher's PSLD) を用いて検定した。同様に、4週、12週後の生体力学的剛性値について対照群、低及び高用量BMP群の個々の値を平均化し、同時期の剛性値について分散分析にて有意差を確認した後、Fisher's PSLDを用いて検定した。結果は平均値±標準偏差で表示し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

(5) 研究結果

実験動物は術後感染の徴候は認めず、神経学的脱落症状も認めなかった。実験動物は術後約1時間にて経口摂取、歩行可能となり、3日後にはほぼ通常の行動が可能となった。検討箇所は、1個体3カ所で、14頭計42移植部位であった。

1) 放射線学的評価

X線単純写及びCTスキャンにて評価した各群における移植HA周囲の骨形成、移植HAの亀裂、圧壊の所見を表2にまとめた。移植HA周囲の骨形成は術直後(図1)及び4週後の検体では認めなかった。術後12週において対照群では骨形成を認めないものの(図2a、3a)、低用量BMP群では2例(33%)に、高用量BMP群では4例(67%)に骨形成を認めた(図2b、3b)。高用量BMP群の1例において椎間腔内の骨形成のみ

ならず、プレートの下端を囲んで椎体前方に骨形成を認めた。移植HAの亀裂は術後4週の評価にて対照群、低用量BMP群、高用量BMP群でそれぞれ3例、1例、2例であり、術後12週でそれぞれ1例、1例、2例であった。移植HAの圧壊は術後12週の低用量BMP群で1例認めたのみであった。従って観察期間の長期化に伴う移植HAの合併症増加の傾向は認めなかった。全群全期間において移植HAの逸脱及び前方プレートの脱転は認めなかった。

表3に示す如く移植HA部位の骨密度は対照群、低及び高用量BMP群いずれも経時的に増加した。術後4週及び12週における各群間の比較では骨密度に有意差を認めなかった。移植HA周囲の母床骨における骨密度は対照群を除き経時的に増加した。また、術後4週における各群間の比較では対照群の骨密度が他群に比べ高値であったが有意差を認めなか

った。術後12週ではこの傾向は逆転し、対照群に対し高用量BMP群の骨密度は有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

2) 生体力学的評価

用手的試験の結果を表4に示す。椎間癒合を認めた移植部位は術後4週で対照群で1例 (17%)、低用量BMP群では0例、高用量BMP群で2例 (33%) であった。術後12週では対照群及び低用量BMP群にてそれぞれ2例 (33%) の椎間癒合を認めたのに対し高用量BMP群では全移植部位で骨性の椎間癒合を認めた。

力学的試験の結果を図4に示す。全検体において試験荷重中の靱帯、関節構造、椎体の損傷あるいは移植HAの破損は認めなかった。全荷重方向において対照群、低及び高用量BMP群いずれも経時的に剛性値の増加を認めた。術後4週における各群間の比較では前

屈方向の荷重にて高用量BMP群の剛性値が対照群に対し有意に増加していた ($p < 0.05$)。前屈以外の荷重方向では各群間の剛性値に有意差は認めなかった。術後12週における各群間の比較では前屈方向の荷重にて高用量BMP群の剛性値が対照群に対し著明に上昇し ($p < 0.01$)、低用量BMP群に対しても剛性値が有意に上昇していた ($p < 0.05$)。後屈方向の荷重においては高用量BMP群の剛性値が対照群に対し有意に上昇し ($p < 0.05$)、側屈方向の荷重では高用量BMP群の剛性値が対照群に対し有意に上昇していた ($p < 0.05$)。回旋方向の荷重負荷においては各群間の有意差を認めなかった。

3) 組織学的評価

組織学的評価を表5に示す。

術後4週において対照群では移植HA周辺

に骨沈着は認めず、4例（67%）に結合組織あるいは軟骨組織の形成を認め、残りの2例（33%）では移植HA周囲に組織形成を認めなかった。これに対し低用量BMP群では2例（33%）で移植HA全周に対し25%未満の軽度骨新生を認め、他の4例（67%）において結合組織あるいは軟骨組織の形成を認めた。高用量BMP群では4例（67%）で移植HA周囲に軽度骨新生を認め、更にその中に1例（17%）に移植HAの気孔内に骨新生している所見が認められた。他の2例（33%）において結合組織あるいは軟骨組織の形成を認めた。対照群と比較してBMPを使用した両群ではいずれも軟骨の形成範囲は広範であった。

術後12週において対照群では1例（17%）で移植HA全周に対し50%未満の中等度骨新生を、4例で軽度（67%）の骨新生を認め、軽度骨新生を認めた中の1例（17%）で気孔内骨新生を認めた。残りの1例（17%）は結

合組織の形成を認めたのみであった（図5）。低用量BMP群では各々3例（50%）で移植HA周囲の軽度あるいは中等度の骨新生を認め、うち各々1例（17%）に気孔内軟骨及び骨新生を認めた（図6a、6b）。高用量BMP群では軽度、中等度あるいは移植HA全周に対し50%以上の高度骨新生をそれぞれ1例（17%）、3例（50%）、2例（33%）に認めた。これらのうち気孔内の骨形成は中等度あるいは高度の周囲骨新生を認めたうち、各々1例（17%）で認められた（図7a、7b）。移植HA周囲の石灰化骨は各群とも主にwoven boneから移行していた。また、気孔内の石灰化骨も主にwoven boneからの移行を認めたものの、BMP使用群の一部に軟骨組織より石灰化骨の移行が認められた。以上、BMP使用群では対照群と比較し、移植HA周囲の骨新生が著明であった。気孔内の骨新生の範囲は対照群、BMP使用群伴に

移植HA表面より最大でも2-3mmであったが、全体の気孔面積に占める骨新生面積はBMP使用群で著明であった。また高用量BMP群では気孔内の骨新生と共に血管新生の所見を認める箇所も存在した。

(6) 考 察

椎間移植骨としての多孔性HA

HAセラミックス製の人工骨を椎間の移植骨として用いる場合、自家骨採取に伴う患者の負担を軽減する他に、一定の性状をもつ移植骨を制限無く用いることができる利点がある。また他の代用骨、例えばメチルメタクリレート等と比較して生物活性(bioactive)を持つため、直接母床骨との癒合が期待できる^{2,2)}。一方多孔性HAの短所は、骨癒合までの初期強度が劣っていることである。初期の実験的研究では、HAセラミックス骨の脆弱性が指摘されている^{3,2),3,5)}。1986年Cookら^{3,6)}はイヌの頸椎椎間固定に緻密性あるいは50%気孔率を有する多孔性HAを使用し、ほとんどの全例に移植骨の骨折を認め、39%に移植骨の逸脱を認めた。これらの報告に反し、近年の基礎的研究では多孔性HAを頸椎椎間移植骨として使用した場合満足す

べき結果が得られている^{37, 38)}。1995年
Tothら²¹⁾はヤギ頸椎に対し30、50、70%
気孔率のHA/リン酸三カルシウムセラミッ
クスあるいは自家腸骨を移植片として椎間固
定術を施行し椎間癒合を3及び6カ月後に評
価した。放射線学的及び組織学的癒合率は6
カ月後でセラミックス群が自家骨群よりも優
れており、力学的検討においても自家骨との
差を認めなかった。しかし彼らの実験で対照
とした自家骨移植群自体、組織学的骨癒合率
は術後3カ月で0%、術後6カ月で50%と低
く、説得力に欠ける。本研究においても移植
後HAの亀裂・圧壊は、前方プレート固定に
も関わらず、使用したrhBMP-2の量とは無
関係に、また観察期間の長さに依存せず各群
とも6椎間中1-3椎間に観察された。実験動
物は術後安静を保つことが困難であり、
Tothら²¹⁾が報告したように移植HAの亀裂
や圧壊はその強度が不十分な移植初期に発生

している可能性が高いと考えられた。元来
HAセラミックスは圧縮強度に比べ張力に脆
く、衝撃吸収能も乏しいため物理的強度が要
求される頸椎再建素材としての応用には更に
工夫が必要と思われる³⁷⁾。

rhBMP-2の骨化作用

BMP-2の生体内での骨新生作用には動物
種、使用部位、用量、担体等の因子が関連し
ている^{12, 13, 39-42)}。

rhBMP-2の骨化促進作用はこれまでラッ
ト、ウサギ、イヌ、ヒツジ、サルなどの動物
種においてその効果が確認され^{11, 25-30, 43)}、
1997年Kirker-Headら⁴⁴⁾は上顎洞床増
床法としてrhBMP-2を使用しヤギにおいて
も骨形成促進作用を確認した。脊椎再建にお
けるrhBMP-2の応用に限ってもこれまで数
種類の動物モデルが用いられている。1995
年Schimandleら²⁹⁾はウサギの腰椎に、

1996年Sheehanら³⁰⁾、1997年Helmら⁴³⁾はイヌの腰椎にrhBMP-2を使用し、後側法固定における椎間癒合促進を証明した。またZdeblickら³³⁾は、1998年ヤギのcervical interbody fusion cageを使用した頸椎椎間癒合にrhBMP-2を用いてその有用性を報告している。実験的報告が蓄積するにつれ実験動物が高等であるほど、骨新生に必要なBMP-2量は増加することが明らかになった²⁸⁾。よって実験動物で有効なBMP-2量を直接ヒトにあてはめることは危険であり、サル等の高等動物での検討が更に必要と考えられる。

BMP-2の使用部位に関して、本実験で行った前方の椎体間固定は、脊椎後方固定と比較して移植骨との接触面が大きく、作用発現に必要なサイトカインの供給面からも、BMP-2の効果発現に有利な環境にあると考えられる²⁸⁾。よってより低用量のBMP-2

で骨新生が期待できる可能性がある。事実本研究では、供給量の制限からこれまでの後方固定に用いられていた r h B M P - 2 量よりも低用量を用いたが、有意な骨新生効果を見出した。

これまでの動物実験では r h B M P - 2 の骨形成効果は用量依存的であるという見解が多いが、1996年 Sandhu ら²⁸⁾ は使用量に関する実験としてイヌの腰椎後側方固定にポリ乳酸を担体とし 58、115、230、460、920 μ g の r h B M P - 2 を使用してその効果を検討した。彼らの報告では全ての r h B M P - 2 使用量において骨癒合効果を認めたものの使用量に依存した効果は認めず、ある閾値を境界として r h B M P - 2 の効果は一定であると結論している。本研究での r h B M P - 2 使用量においては、術後12週の放射線学的骨形成あるいは術後4及び12週の組織学的評価において5 μ g の低用量 B M P 使用群では対照群と比較し

骨癒合過程の促進を認めた。更に高用量 BMP 群では低用量 BMP 使用群と比較し生体力学的に有意に脊椎安定性の向上を認め、組織学的に骨癒合促進を認めた。従って本研究で使用了比較的低用量域では rh BMP - 2 の骨新生効果は用量に依存すると考えられた。過量の rh BMP - 2 局所投与は骨過形成あるいは異所性骨化の潜在的危険性を伴う可能性がある。しかし、本研究の使用量においては椎間腔を越えた前方への骨形成を高用量 BMP 群の 1 例にて認めたものの、頸椎近傍の筋肉、食道等への異所性骨化は認めなかった。

rh BMP - 2 担体としての HA

BMP - 2 の効果発現には、適切な担体の存在が必要である。BMP - 2 は血中半減期が短く単体では容易に拡散するため、生体内では適切な担体が存在しない場合の骨形成効果は期待できない。脱灰骨基質、コラーゲン、ポ

リ乳酸などの物質が担体として用いられているが^{1,2,15,28-30,33,41-43,45)}、HAもその一つとして報告されている。1992年 Ropamontiら⁴⁵⁾がサル⁴⁵⁾の筋肉内に rhBMP-2 の担体として多孔性HAを単独で使用し骨形成を認め、それ以降も多孔性HA単独でのBMP-2担体としての有用性を確認した報告が散見される^{1,2,15,41,42)}。本研究においても rhBMP-2 使用群で骨形成促進を認めており、多孔性HAは単に椎間の移植代用骨としての働きのみならず rhBMP-2 の担体としても有用と考えられた。将来 rhBMP が臨床的に使用可能となれば rhBMP-2 及び HA 複合体が遊離骨移植に代わる手法として期待できるものと推定された。今後更に多孔性HAに結合した rhBMP-2 が生体内の局所環境でどのような動態をとるのか詳細な検討が必要である。

rhBMP-2 の椎体癒合促進作用

本研究では術後4週で全群ともに放射線学的骨形成を認めなかったものの組織学的にはBMP使用群で移植骨周囲の骨新生を認め、更に高用量BMP使用群において気孔内骨新生も認めた。また同時期の生体力学的検討でも高用量BMP群で前屈方向で対照群と比較し有意差を認め、椎間癒合の時間的促進効果が考察された。術後12週では骨癒合の傾向はrhBMP-2の使用量に依存し更に著明となりその有用性が確認された。rhBMP-2を併用した場合の移植骨および母床骨の骨新生所見は、放射線学的、組織学的観察により移植HAと母床骨間にて著明であった。骨密度測定においては移植骨に相当する部分の骨密度は対照群と比較し、低あるいは高用量BMP群で有意差を認めなかったが、移植骨周囲の母床骨の骨密度は術後12週の高用量BMP群にて有意に増加していた。組織学的評価にお

いても、低あるいは高用量BMP群で使用量に依存し移植HA表面の骨沈着が著明であり、その骨形成過程は主に膜性骨化と考えれた。rhBMP-2の使用量および観察期間に伴い、移植HAの気孔内骨新生の所見も認めたが、骨新生は局所的でHA表面から2-3mm程度にとどまっていた。Onoら^{14,15)}は、ラット頭蓋において本研究と同様の低用量rhBMP-2とより気孔率の高い多孔性HAを用いて顕著な気孔内骨化を観察している。よって気孔内骨化は、今回用いた用量のrhBMP-2よりも気孔率および気孔間連結孔の大きさや数により大きく依存している可能性が示唆される。以上の結果から、本実験で得られた生体力学的強度の上昇は、HA表面と母床骨間の骨新生促進によるものと考えられた。

(7) 結 論

1. ヤギ頸椎の3椎間における椎間板を摘出し、前及び後縦靱帯を切除することにより頸椎不安定モデルを作製した。
2. 作製した動物モデルを用いて、低用量あるいは高用量rhBMP-2を含有した多孔性HA椎間スパーサーを移植し、in vivoで椎体間癒合を経時的多面的に評価し、rhBMP-2併用による骨癒合促進の効果を検討した。
3. 対照と比較し、rhBMP-2は放射線学的及び組織学的に用量依存性に移植HAと母床骨の骨癒合を促進した。またそれに伴い生体力学的強度も増加すると考えられた。
4. 多孔性HAはrhBMP-2の担体として有用であると考えられた。

(8) 文 献

- 1) Robinson, R.A., Walker, A.E., Ferlie, D.C., et al. (1962) The results of anterior interbody fusion of the cervical spine. *J. Bone Joint Surg.*, 44A, 1569-1587.
- 2) White, A.A. III, Southwick, W.O., Duponte, R.J., et al. (1973) Relief of pain by anterior cervical spine fusion for spondylosis. *J. Bone Joint Surg.*, 55A, 525-534.
- 3) Banwart, J.C., Asher, M.A., and Hassanein, R.S. (1995) Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine*, 20, 1055-60.
- 4) Summers, B.N., and Eisenstein S.M. (1989) Donor site pain from

the ilium: A complication of
lumbar spine fusion. *J. Bone Joint
Surg.*, 71B, 677-680.

5) Younger, W.M., and Chapman,
M.W. (1989) Morbidity at bone
graft donor site. *J. Orthop. Res.*,
Trauma, 3, 192-195.

6) Urist, M.R. (1965) Bone
formation by autoinduction. *Nobel
Science*, 150, 893-899.

7) Urist, M.R., DeLange, R.J.,
and Finerman, G.A.M. (1983) Bone
cell differentiation and growth
factors. *Science*, 220, 680-686.

8) Wolfman, N.M., Hattersley, G.,
Cox, K., et al. (1997) Ectopic
induction of tendon and ligament
in rats by growth and
differentiation factors 5, 6, 7,

- members of the TGF- β gene family. *J. Clin. Invest.*, 100, 321-330.
- 9) Wozney, J.M. (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.*, 32, 160-167.
- 10) Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., et al. (1988) Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*, 242, 1528-1534.
- 11) Cole, B.J., Bostrom, M.P.G., Pritchard, T.L., et al. (1997) Use of bone morphogenetic protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. *Clin. Orthop.*, 345, 219-228.
- 12) Kuboki, Y., Takita, H.,

Kobayashi, D., et al. (1998) BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and non feasible structures: topology of osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.*, 39, 190-199.

13) Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., et al. (1997) Self-regenerating bone implant: ectopic osteoinduction following intramuscular implantation of a combination of rhBMP-2, atelopeptide type I collagen and porous hydroxyapatite. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 24, 360-365.

14) Ono, I., Gunji, H., Kaneko, F., et al. (1995) Efficacy of

hydroxyapatite ceramic as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein. *J. Craniofac. Surg.*, 6, 238-244.

15) Ono, I., Inoue, M., and Kuboki, Y. (1996) Promotion of the osteogenetic activity of recombinant human bone morphogenetic protein by prostaglandin E1. *Bone*, 19, 581-588.

16) Yamaguchi, A., Ishizuya, T., Kintou, N., et al. (1996) Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 220, 366-71.

- 17) Inada, M., Katagiri, T., Akiyama, S., et al. (1996) Bone morphogenetic protein-12 and -13 inhibit terminal differentiation of myoblasts, but do not induce their differentiation into osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 222, 317-22.
- 18) Rosen, V., Nove, J., Song, J.J., et al. (1994) Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes. *J. Bone Miner. Res.*, 9, 1759-1768.
- 19) Cook, S.D., Dalton, J.E., Tan, E.H., et al. (1994) In vivo evaluation of anterior cervical

fusions with hydroxyapatite graft material. *Spine*, 19, 1856-1866.

20) Pintar, F.A., Maiman, D.J., Hollowell, J.P., et al. (1994) Fusion rate and biomechanical stiffness of hydroxyapatite versus autogenous bone grafts for anterior discectomy. *Spine*, 19, 2524-2528.

21) Toth, J.M., An, H.S., Lim, T.H., et al. (1995) Evaluation of porous biphasic calcium phosphate ceramics for anterior cervical interbody fusion in a caprine model. *Spine*, 20, 2203-2210.

22) Rawlings, C.E. (1993) Modern bone substitutes with emphasis on calcium phosphate ceramics and osteoinductors. *Neurosurgery*, 33,

- 935-938. S.D., Dalton, J.B., Tann
23) Kim, P., Wakai, S., Matsuo,
E., et al. (1998) Bisegmental
cervical interbody fusion using
hydroxyapatite implants: surgical
results and long-term observation
in 70 cases. *J. Neurosurg.*, 88,
21-27. S.D., Dalton, J.B., Tann
24) Senter, H.J., Kortyna, R., and
Kemp, W.R. (1989) Anterior
cervical discectomy with
hydroxyapatite fusion. *Clin.
Neurosurgery*, 25, 39-43.
25) Boden, S.D., Martin, G.J. Jr.,
Horton, W.C., et al. (1998)
Laparoscopic anterior spinal
arthrodesis with rhBMP-2 in a
titanium interbody threaded cage.
J. Spinal Disord., 11, 95-101.

- 26) Cook, S.D., Dalton, J.E., Tan, E.H., et al. (1994) In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein (rh OP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusions. *Spine*, 19, 1655-1663.
- 27) Muschler, G.F., Hypdo, A., Manning, T., et al. (1994) Evaluation of human bone morphogenetic protein 2 in a canine spinal fusion model. *Clin. Orthop.*, 308, 229-240.
- 28) Sandhu, H.A., Kanim, L.E., Kabo, J.M., et al. (1996) Effective dose of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. *Spine*, 21, 2115-2122.

29) Schimandle, J.H., Boden, S.D.,
and Hutton, W.C. (1995)

Experimental spinal fusion with
recombinant human bone
morphogenetic protein-2. *Spine*,
20, 1326-1337

30) Sheehan, J.P., Kallmes, D.F.,
Jane, J.A., et al. (1996)

Molecular methods of enhancing
lumbar spinal fusion.
Neurosurgery, 39, 548-554.

31) Zdeblich, T.A., Cooke, M.E.,
Kunz, D.N., et al. (1994) Anterior
cervical discectomy and fusion
using a porous hydroxyapatite
bone graft substitute. *Spine*, 19,
2348-2358.

32) Shima, T., Keller, J.T.,
Alvira, M.M., et al. (1979)

Anterior cervical discectomy and interbody fusion. An experimental study using a synthetic tricalcium phosphate. *J. Neurosurg.*, 51, 533-538.

33) Zdeblik, T.A., Ghanayem, A.J., Rapoff, A.J., et al. (1998) Cervical interbody fusion cages. An animal model with and without bone morphogenetic protein. *Spine*, 23, 758-766.

34) Lipscomb, H.J., Grubb, S.A., and Talmage, R.V. (1989) Spinal bone density following spinal fusion. *Spine*, 14, 477-479.

35) Emery, S., Fuller, D.A., and Stevenson, S. (1996) Ceramic anterior spinal fusion: Biologic and biomechanical comparison in a

canine model. *Spine*, 21, 2713 -

2719. *cal spine fusion. Spine*, 15,

36) Cook, S.D., Reynold, M.C.,

Whitecloud, T.S., et al. (1986)

Evaluation of hydroxyapatite

graft materials in canine cervical

spine fusion. *Spine*, 11, 305-309.

37) Takahashi, T., Tominaga, T.,

Yoshimoto, T., et al. (1997)

Biomechanical evaluation of

hydroxyapatite intervertebral

graft and anterior cervical

plating in a porcine cadaveric

model. *BioMed. Mater. Eng.*, 7,

121-127. *gali. A. Shimamura, N.*

38) Wittenberg, R.H., Moeller, J.,

Shea, M., et al. (1990)

Compressive strength of

autologous and allogeneous bone

grafts for thoracolumbar and cervical spine fusion. *Spine*, 15, 1073-1078.

39) Boden, S.D., and Schimandle, J.H. (1995) Biologic enhancement of spinal fusion. *Spine*, 20, 113S-123S.

40) Damien, C.J., Parsons, J.R., Benedict, J.J., et al. (1990) Investigation of a hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 639-654.

41) Kamegai, A., Shimamura, N., Naitou, K., et al. (1994) Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite

- as a delivery system. *BioMed. Mater. Eng.*, 4, 291-307.
- 42) Tsuruga, E., Takita, H., Wakisaka, Y., et al. (1997) Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem. (Tokyo)*, 121, 317-324.
- 43) Helm, G.A., Sheehan, J.M., Sheehan, J.P., et al. (1997) Utilization of type I collagen gel, demineralized bone matrix, and bone morphogenetic protein-2 to enhance autogenous bone lumbar spinal fusion. *J. Neurosurg.*, 86, 93-100.
- 44) Kirker-Head, C.A., Nevins, M., Palmer, R., et al. (1997) A new animal model for maxillary

sinus floor augmentation:

Evaluation parameters. *Int. J.*

Oral Maxillofac. Implants., 12,

403-411.

45) Ripamonti, U., Ma, S., and

Reddi, A.H. (1992) The critical

role of geometry of porous

hydroxyapatite delivery system in

induction of bone by osteogenin,

a bone morphogenetic protein.

Matrix, 12, 202-212.

图 1



图2

$\frac{a}{b}$

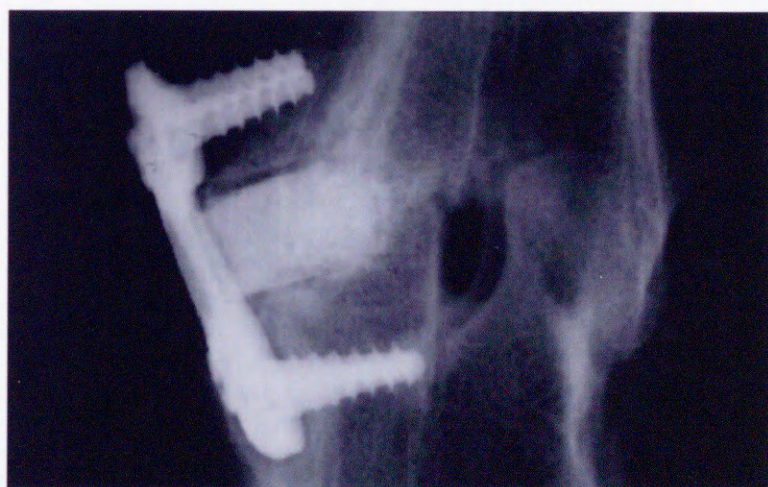
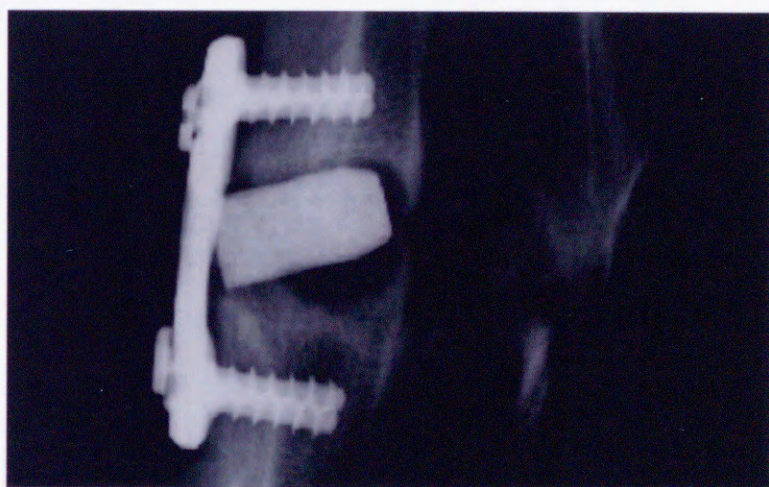
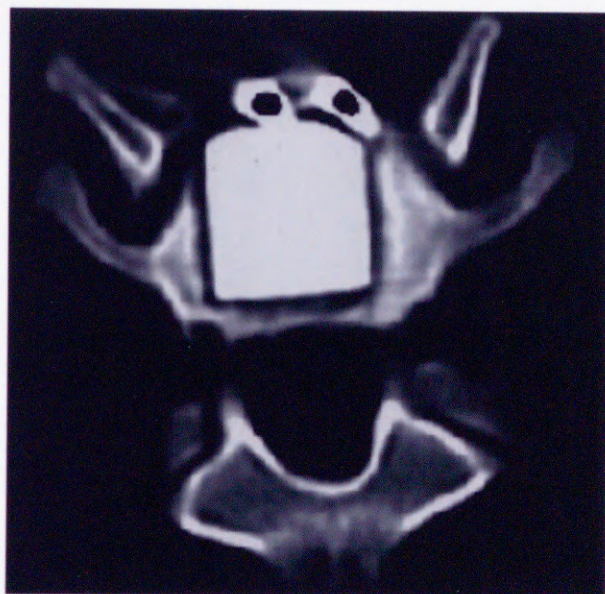
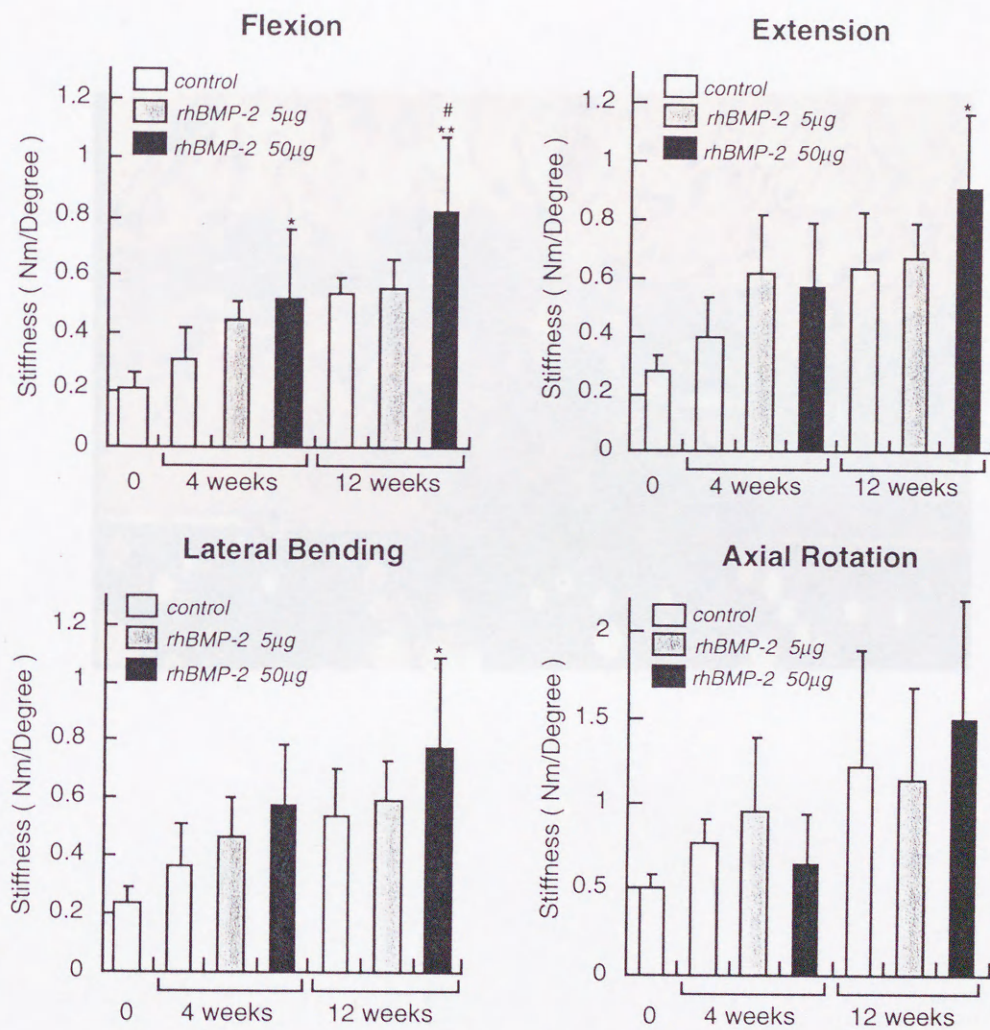


图3

$\frac{a}{b}$





☒ 5

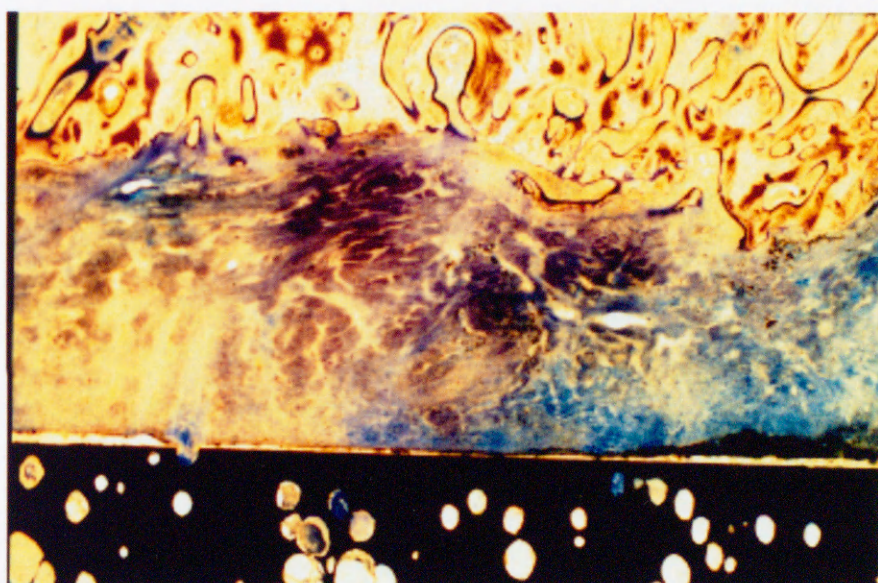


图6

$\frac{a}{b}$

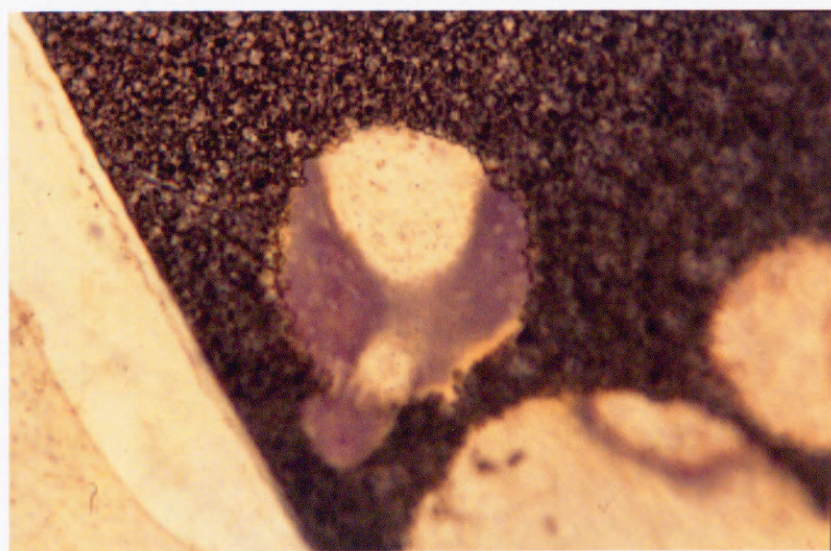
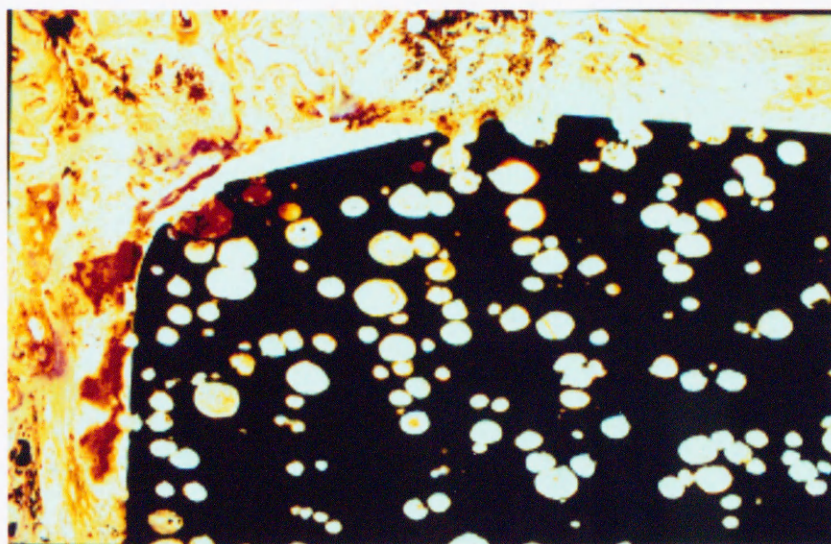
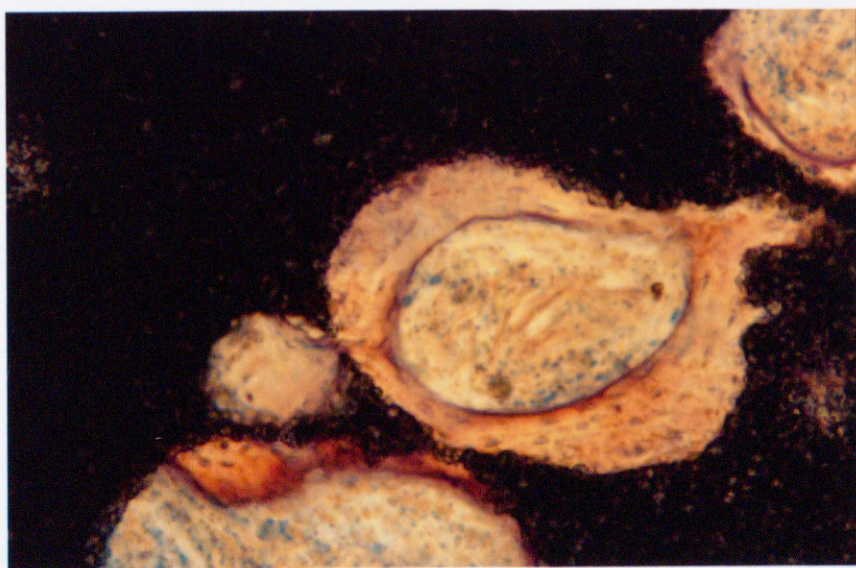
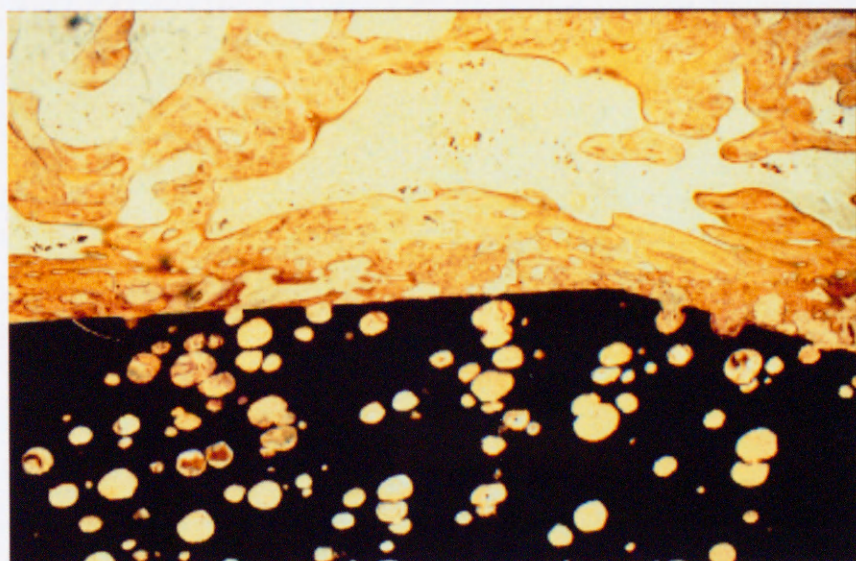


图 7

$\frac{a}{b}$



図説明文

図 1.

術直後、頸椎 X 線側面像。頸椎 3 / 4、4 / 5、5 / 6 椎間に HA 椎間スパーサーを移植し、前方プレートを施した。

図 2.

術後 12 週、頸椎 X 線側面像。対照群 (a) では移植 HA 周囲の骨形成は認めず、移植 HA 後面及び下面に透明帯が認められた。高用量 BMP 使用群 (b) では移植 HA 周囲に骨新生を認め、移植 HA と母床骨の境界が不鮮明であった。また前方プレート下縁にプレートを包み込むように骨新生が認められた。

図 3.

術後 12 週、CT 横断像。対照群 (a) では移植 HA 周囲の骨形成は認めなかった。高用量 BMP 使用群 (b) では移植 HA 周囲の骨新生

があり母床骨との連続性が認められた。また移植骨一部が破損し周囲に分散している所見が認められた。

図4.

前屈 (flexion)、後屈 (extension)、側屈 (lateral bending)あるいは回旋 (axial rotation) 方向荷重負荷における対照群、低用量及び高用量BMP使用群の経時的な生体力学的剛性値の変化。

*: $p < 0.05$ v.s. control at the same period, **: $p < 0.01$ v.s. control at the same period,

#: $p < 0.05$ v.s. low dose rhBMP-2 group at the same period (Fisher's PSLD test)。

図5.

術後12週の対照群における組織学的所見。

Villanueva bone 染色、 2.5×2 。

移植HAと母床骨間には新生骨による連続性は認めず、間隙に結合織および一部に軟骨形成を認めた。

図6.

術後12週の低用量BMP使用群における組織学的所見。Villanueva bone 染色、a:

2.5×2 、b: 5×10 。

弱拡大(a)では母床骨から移植HA間に移植HAを取り囲むように骨新生し、一部移植HAに直接結合している所見が認められた。

強拡大(b)では気孔内に軟骨新生が認められた。

図7.

術後12週の高用量BMP使用群における組織学的所見。Villanueva bone 染色、a:

2.5×2 、b: 5×10 。

弱拡大（a）では移植HA周囲に広範に骨新生が認められた。気孔内にも骨形成を認めたが範囲は移植HA表面から2-3mm程度であった。強拡大（b）では気孔内の辺縁に石灰化骨の形成を認めた。

Grade 1: 移植HA周囲に骨新生が認められ、骨形成の範囲が25%未満

(移植HA周囲に骨新生が認められ、骨形成の範囲が25%未満)

未満)

Grade 2: 移植HA周囲に骨新生が認められ、骨形成の範囲が25%以上50%未満

(移植HA周囲に骨新生が認められ、骨形成の範囲が25%以上50%未満)

以上50%未満)

Grade 3: 移植HA周囲に骨新生が認められ、骨形成の範囲が50%以上

(移植HA周囲に骨新生が認められ、骨形成の範囲が50%以上)

以上)

a: 気孔内の骨形成

b: 気孔内の骨形成

表 1. 組織学的評価基準

Grade 0 : 移植 HA 周囲に全く組織形成なし

Grade 1 : 移植 HA 周囲に線維血管組織ある
いは軟骨組織の形成あり

Grade 2 : 移植 HA 周囲の軽度骨新生あり

(移植 HA 全周にに対し骨新生の範囲が 25 %
未満)

Grade 3 : 移植 HA 周囲の中等度骨新生あり

(移植 HA 全周にに対し骨新生の範囲が 25 %
以上 50 % 未満)

Grade 4 : 移植 HA 周囲の高度骨新生あり

(移植 HA 全周にに対し骨新生の範囲が 50 %
以上)

a : 気孔内の骨新生なし

b : 気孔内の骨新生あり

表 2. 対照群、低用量 BMP 群及び高用量

BMP 群における放射線学的所見

| | Bone formation | Graft fracture | Graft collapse |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>0 week</i> | | | |
| control | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| <i>4 weeks</i> | | | |
| control | 0/6 | 3/6 | 0/6 |
| rhBMP-2 5 µg | 0/6 | 1/6 | 0/6 |
| rhBMP-2 50 µg | 0/6 | 2/6 | 0/6 |
| <i>12 weeks</i> | | | |
| control | 0/6 | 1/6 | 0/6 |
| rhBMP-2 5 µg | 2/6 | 1/6 | 1/6 |
| rhBMP-2 50 µg | 4/6 | 2/6 | 0/6 |

表3. 対照群、低用量BMP群及び高用量
BMP群における移植骨及び母床骨の骨密度
(g/cm²)

| | Hydroxyapatite implant | Host bone |
|-----------------|------------------------|----------------|
| <i>0 weeks</i> | | |
| control | 1.392 ± 0.082 | 0.868 ± 0.060 |
| <i>4 weeks</i> | | |
| control | 2.143 ± 0.268 | 1.187 ± 0.197 |
| rhBMP-2 5 µg | 2.178 ± 0.184 | 1.052 ± 0.299 |
| rhBMP-2 50 µg | 2.088 ± 0.194 | 1.030 ± 0.145 |
| <i>12 weeks</i> | | |
| control | 2.266 ± 0.121 | 1.128 ± 0.132 |
| rhBMP-2 5 µg | 2.256 ± 0.357 | 1.181 ± 0.271 |
| rhBMP-2 50 µg | 2.320 ± 0.318 | 1.285 ± 0.176* |

Data are expressed as mean ± standard deviation. * p<0.05 vs. control; ANOVA followed by Fisher's test.

表4. 対照群、低用量BMP群及び高用量
BMP群における用手的試験による骨癒合

| | solid bony fusion |
|---------------|-------------------|
| 0 week | |
| control | 0/6 |
| 4 weeks | |
| control | 1/6 |
| rhBMP-2 5 µg | 0/6 |
| rhBMP-2 50 µg | 2/6 |
| 12 weeks | |
| control | 2/6 |
| rhBMP-2 5 µg | 2/6 |
| rhBMP-2 50 µg | 6/6 |

表 5 . 対 照 群 、 低 用 量 B M P 群 及 び 高 用 量
B M P 群 に お け る 組 織 学 的 分 類

| Grade | 0 | 1 | 2a | 2b | 3a | 3b | 4a | 4b |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>0 week</i> | | | | | | | | |
| control | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| <i>4 weeks</i> | | | | | | | | |
| control | 2/6 | 4/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| rhBMP-2 5 μ g | 0/6 | 4/6 | 2/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| rhBMP-2 50 μ g | 0/6 | 2/6 | 3/6 | 1/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| <i>12 weeks</i> | | | | | | | | |
| control | 0/6 | 1/6 | 3/6 | 1/6 | 1/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| rhBMP-2 5 μ g | 0/6 | 0/6 | 2/6 | 1/6 | 2/6 | 1/6 | 0/6 | 0/6 |
| rhBMP-2 50 μ g | 0/6 | 0/6 | 1/6 | 0/6 | 2/6 | 1/6 | 1/6 | 1/6 |

Histological grading: 0, no evidence of tissue formation surrounding implants; 1, fibrovascular tissue and cartilage formation surrounding implant; 2, direct bone apposition (<25%) to implant surface; 3, direct bone apposition (25-50%) to implant surface; 4, direct bone apposition (>50%) to implant surface; a, bone incorporation into pores absent; b, bone incorporation into pores present

表 2. 4 週間後、脱臼鼠 BMB 骨及び癒着部

BMB 骨に於ける組織学的所見

| Grade | 0 | 1 | 2a | 2b | 3a | 3b | 4a | 4b |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 2 weeks | | | | | | | | |
| control | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 4 weeks | | | | | | | | |
| control | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| exposed 2 days | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| exposed 2 days | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 12 weeks | | | | | | | | |
| control | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| exposed 2 days | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| exposed 2 days | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

Histological grading: 0, no evidence of tissue formation

surrounding ligament; 1, fibrovascular tissue and cartilage

formation surrounding ligament; 2, direct bone apposition (<25%)

to ligament surface; 3, direct bone apposition (25-50%) to

ligament surface; 4, direct bone apposition (>50%) to ligament

surface; a, bone incorporation into pores absent; b, bone

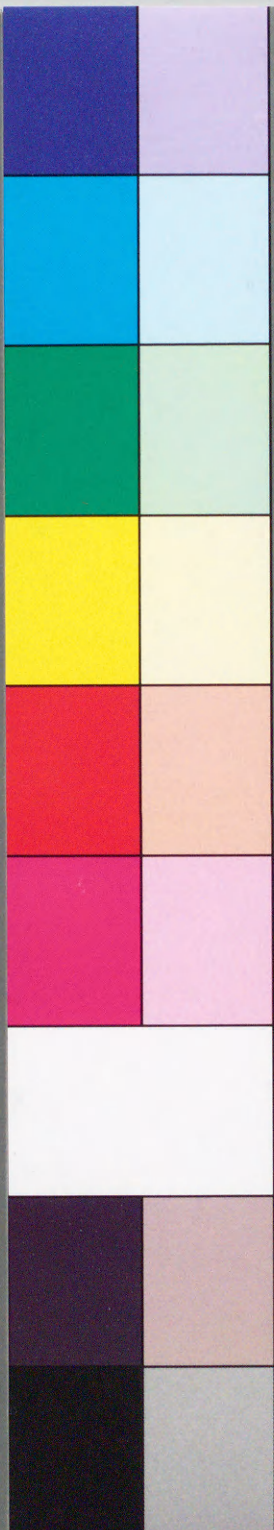
incorporated into pores present

inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

